

パイエル板上の Microfold Cell (M細胞) による *Streptococcus Pyogenes* 並びに Streptococcus Preparation OK-432 の取りこみに関する形態学的研究

長崎 貞臣

従来より経口的に投与された溶連菌製剤 OK-432 が小腸や Peyer 板近傍の腸管から吸収され、Peyer 板リンパ濾胞、腸間膜リンパ節に出現し、消化管付属リンパ組織を介して生物学的修飾物質として生体の免疫能を賦活するという報告がなされている。しかしながら腸管のいかなる細胞から菌体が摂取されるかについての研究はなされていない。そこで、著者はウサギ小腸を用い、*Streptococcus pyogenes* A 群 Su 株、ATCC 2106、溶連菌製剤 OK-432 の小腸内投与実験を行い、これら菌体が小腸のいかなる細胞から摂取されるかについて電顕的検索を行った。その結果、これら菌体は投与後 1 時間で Peyer 板上の M 細胞に付着し、5 時間後には M 細胞の細胞質内に取りこまれ、また M 細胞に相接し、内包されているマクロファージ、リンパ球の細胞質内に転送されている像を確認した。他のリンパ濾胞被蓋上皮細胞、絨毛吸収細胞、吸収上皮細胞間のリンパ球にはかかる像は認められなかった。生物学的反応修飾物質として経口投与される溶連菌製剤 OK-432 は M 細胞より取りこまれ、リンパ球、マクロファージに転送されることを証明した。

(昭和63年10月18日採用)

M Cell Transport of *Streptococcus Pyogenes* and Streptococcus Preparation OK-432 from Intestinal Lumen into Rabbit Peyer's Patches

Sadaomi Nagasaki

It has been reported that the orally administered streptococcal preparation OK-432 was absorbed by the small intestine, especially in the vicinity of Peyer's patches and that it was transported to the mesenteric lymph nodes. However, it is not known by which cells of the intestinal tract, it was first taken up: namely, its portal of entry is unknown. To investigate these issues, in this study, rabbit ileum was inoculated with streptococcal preparation OK-432 and *Streptococcus pyogenes* (A group, type 3, Su strain) respectively, and the intestinal epithelium, including the epithelium overlying the Peyer's patches, was examined electron microscopically. Eight-week-old male New Zealand white rabbits, weighing 2-2.5 kg, were used for the experiment. Suspensions of the streptococcal preparation (50 KE/ml of OK-432) *Streptococcus pyogenes* ($5-6 \times 10^8$ viable bacilli/ml),

respectively, were inoculated into constricted loops of ileum containing a Peyer's patch after laparotomy under anesthesia. The volume of each injection was 1.2-1.5 ml. After one hour and 5 hours, the sections of intestine containing Peyer's patches were excised. Observation was made with a dissecting microscope, a light microscope (H-E staining), and an electron microscope. One hour after inoculation of *Streptococcus* and the streptococcus preparation, electron microscopy revealed that these microorganisms adhered to the apical surface of microfold cells. Five hours after inoculation, these microorganisms were phagocytosed by M cells over Peyer's patch lymphoid follicles, carried in vesicles through the epithelium, and transported among underlying macrophages and lymphocytes. They were not taken up by other follicle epithelial cells or absorptive cells of the villi. In this experiment, orally administered *Streptococcus pyogenes* and the bacterial biological response modifier OK-432 were phagocytized only by M cells, and they were not found in other epithelial cells of intestine.

(Accepted on October 18, 1988) *Kawasaki Igakkaishi* 15(1): 13-22, 1989

Key Words ① M cell ② Peyer's patches ③ *Streptococcus pyogenes*
④ Biological response modifier

はじめに

従来より種々の感染症に対する経口免疫の方法として, Sabin vaccine,¹⁾ BCG,^{2),3)} *Salmonella typhi* Gal-E 変異菌 Ty 21a⁴⁾ などが用いられてきた。これらの微生物は Peyer 板または Peyer 板近傍の腸管から取りこまれるとされているが、腸管のいかなる細胞からどのような形で取りこまれるかについては BCG を除いて明らかにされていない。⁵⁾ また、最近、生物学的反応修飾物質として種々の菌体が経口的に投与されているが、これらの物質も腸管のいかなる細胞から、いかなる形で取りこまれているかについて明らかにされていない。一方、1974年 Owen ら⁶⁾ はヒトリンパ濾胞ドーム表面をおおう粘膜上皮細胞（以下濾胞被蓋上皮細胞と略す）のなかに特異な形態をもつ細胞の存在を明らかにし、Microfold cell または Membranous epithelial cell (M cell)（以下 M 細胞と略す）と呼称した。その後、この細胞は消化管内に投与された native ferritin, horseradish peroxidase, コレラトキシンなどの巨大分子, *Chlamydia*, *Vibrio cholerae*,⁷⁾ *Salmonella*

typhi,⁸⁾ BCG⁹⁾ などの細菌, Reovirus type 1, type 3⁷⁾ などを貪食することが明らかになった。そこで生物学的反応修飾物質の一つである Streptococcus preparation OK-432 並びに *Streptococcus pyogenes* を家兎回腸に局所投与し、これら菌体の取りこまれる部位について詳細な電顕的研究を行った。

実験材料と方法

1. 投与溶連菌並びに溶連菌製剤 OK-432

投与した溶連菌は *Streptococcus pyogenes* A 群 Su 株 ATCC 2106（以下溶連菌と略す）で、中外製薬研究所より提供を受け、ペプトン-ビーフインフュージョン培養液で 37°C, 24 時間培養し、生理食塩水に溶解し、5~9×10⁸/ml の菌体浮遊液となるように調整し使用した。溶連菌製剤 OK-432 は同研究所より提供を受けた上記溶連菌のペニシリン処理菌体製剤で（以下 OK-432 と略す）その 50 K. E. (1 K. E. は凍結乾燥溶連菌 0.1 mg に相当し、菌数約 10⁸ 個) を生理食塩水に溶解し使用した。

2. 実験動物

9羽の生後8週齢の New Zealand white 系雄性家兎、体重2~2.5 kg を使用し、対照群、溶連菌投与群、OK-432 投与群の3群に分け、経時的に実験を行った。

3. 溶連菌並びに OK-432 の形態学的観察

培養した溶連菌は生理食塩水にて希釈、遠心沈殿をくりかえし、その懸濁液の一滴を筒井ら⁹⁾の方法に従ってポリカチオン膜におおわれたカバーガラス上に滴下し、1%グルタルアルデヒド (PBS 緩衝液) で1時間、ついで1%四酸化オスミウムで1時間固定後脱水処理し、臨界点乾燥の後、金パラジウム蒸着し走査電顕にて観察した。OK-432 懸濁液も同様処理し、走査電視した。菌体の透過電顕観察には両者の懸濁液を遠心沈殿したペレットを形のごとく2.5%グルタルアルデヒド (PBS 緩衝液) 1時

間、1%四酸化オスミウム1時間固定を行い脱水、エポン樹脂包埋し超薄切片を作製した。

4. 実験方法

48時間の絶食、飲水のみとした家兎をペントバルビタール (0.5 mg/kg 体重) にて静脈麻酔後開腹、肉眼にて Peyer 板を確認し、Peyer 板を含んで約4 cmの長さに小腸をループ状に結紮し、対照群には生理食塩水を、溶連菌投与群には菌数 $5 \sim 9 \times 10^8$ /ml の懸濁液を、OK-432 投与群には 50 K.E./ml の懸濁液をそれぞれ1.2~1.5 ml 注入した。注入後は閉腹し、投与1時間、5時間後に再開腹し、Peyer 板を含め小腸を外科的にそれぞれ摘出した。

5. 電子顕微鏡による観察

摘出した小腸はすみやかに2.5%グルタルアルデヒド (PBS 緩衝液) にて固定、実体顕微鏡下に観察し、回腸粘膜絨毛部分、Peyer 板

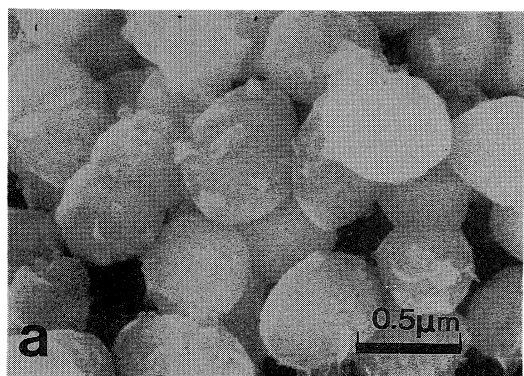


Fig. 1a. Scanning electron micrograph of cultured *Streptococcus pyogenes*

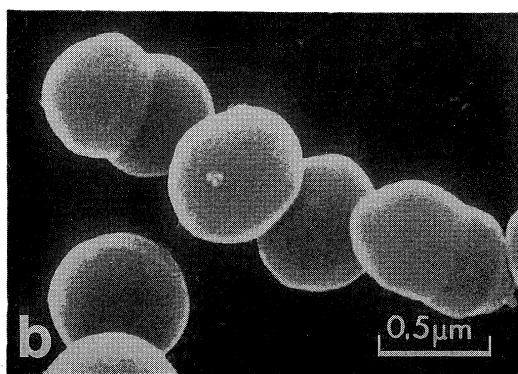


Fig. 1b. Scanning electron micrograph of OK-432

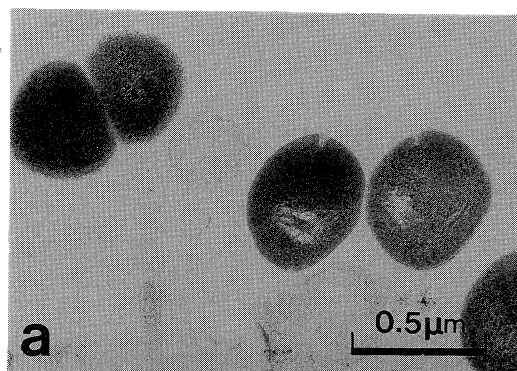


Fig. 2a. Transmission electron micrograph of cultured *Streptococcus pyogenes*

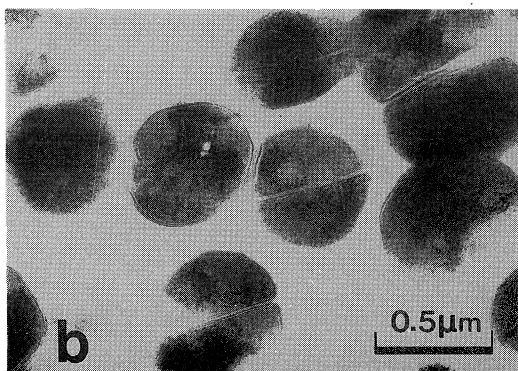


Fig. 2b. Transmission electron micrograph of OK-432

部分を走査電顕標本作製材料は6~7mm角に、
透過電顕標本作製材料は2~3mm角に細切し、
1% 四酸化オスミウムにて2時間固定後エタ

ノール系列で脱水処理した。透過電顕材料はブ
ロピレンオキサイドを経てエポキシ樹脂包埋し、
Porter-Blum MT 2B型ミクロトームを用いダ

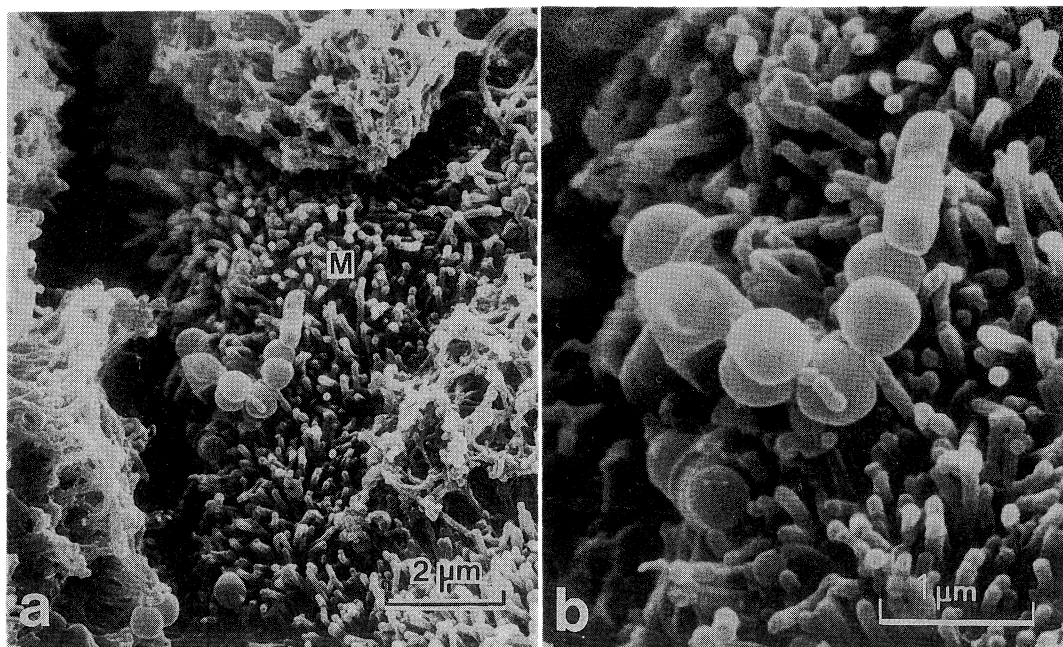


Fig. 3a, b. Scanning electron micrograph 1 hour after inoculation of *Streptococcus pyogenes*.
The microfolds of an M cell catch bacteria (M: Microfold cell).

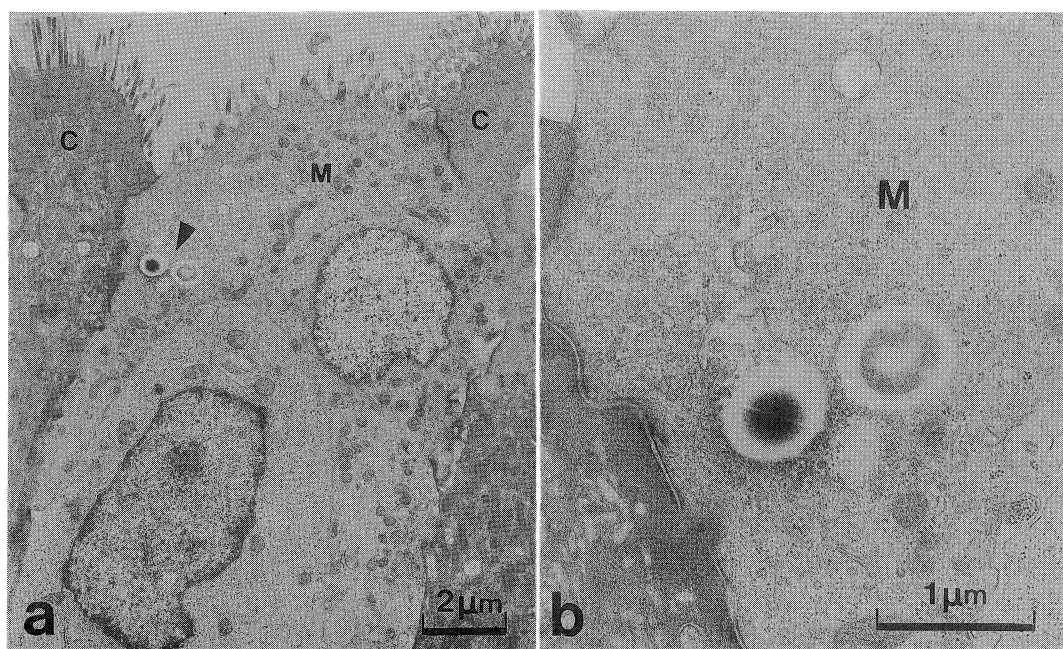


Fig. 4a, b. Transmission electron micrograph showing two bacteria (arrowhead) phagocytized
by an M cell 5 hours after inoculation of *Streptococcus pyogenes*.

イアモンドナイフを用い超薄切片を作製した。観察は酢酸ウラニル・クエン酸鉛二重染色を行い、日立 H-500 透過型電子顕微鏡にて行った。走査電顕材料はイソアミルを経て臨界点乾燥の後、金パラジウム蒸着を行い日立 S-570 走査電子顕微鏡にて観察した。観察域は Peyer 板全域と小腸の絨毛粘膜域について行った。

結 果

1. 溶連菌 並びに OK-432 の菌体の形態観察

培養した溶連菌を走査電顕すると直径 $0.5\ \mu\text{m}$ 前後の球菌として観察され、連鎖は短く、双球菌状を呈するものもある。菌体表面には不規則な構造物が認められた。OK-432 の菌体は双球菌状を呈するものが多いが、表面は平滑でそのような構造物は認めなかった (Fig. 1a, b)。透過電顕像は Figure 2a, b に示すように娘細胞が分離していない双球菌状の像を多く認めた。

2. 溶連菌投与群の電顕的観察

走査電顕にて Peyer 板を観察すると、溶連菌投与後1時間ではリンパ濾胞ドームの濾胞被蓋上皮細胞群に散見するM細胞上に付着する溶連菌と思われる菌体像を認め、菌体に向かって偽足様に伸びる Microfold が観察できた (Fig. 3a, b)。

他の濾胞被蓋上皮細胞には球菌の菌体の付着は全く認められず、まれに桿菌の付着像を認めたのみである。絨毛部の吸収上皮細胞には菌体の付着は全く認めなかった。対照群においてはどの細胞群においても球菌の付着を認めていない。また、透過電顕像ではM細胞内に菌体の取りこみ像は認められなかった。

透過電顕による標本で溶連菌投与後5時間を

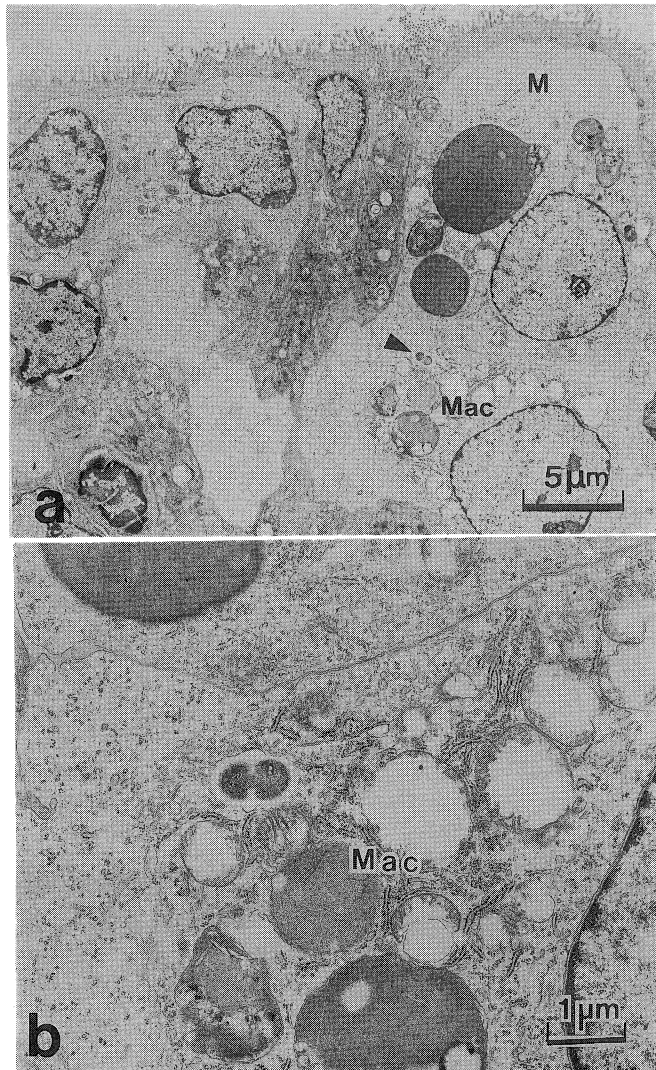


Fig. 5a, b. Transmission electron micrograph of two macrophages engulfed by an M cell. A bacteria (arrowhead) is recognized in the macrophage (Mac: Macrophage).

検討すると、M細胞の細胞質内の小胞内に投与した溶連菌と思われる菌体像を認め (Fig. 4a, b)。さらにM細胞の濾胞被蓋上皮細胞基底膜側の陥凹面につつまこまれるような形で内包されているマクロファージの小胞内に投与した溶連菌と思われる菌体像を認めた (Fig. 5a, b)。

また、濾胞被蓋上皮細胞群の基底膜下のマクロファージにも同様の像を確認した (Fig.

6a, b).

他の濾胞被蓋上皮細胞, 絨毛部の吸収細胞には全くこのような所見は認めなかった。

対照群のあらゆる細胞群の細胞内, 細胞間リンパ球内に菌体像を認めなかった。これらの形態学的所見より, M細胞に付着している菌体,

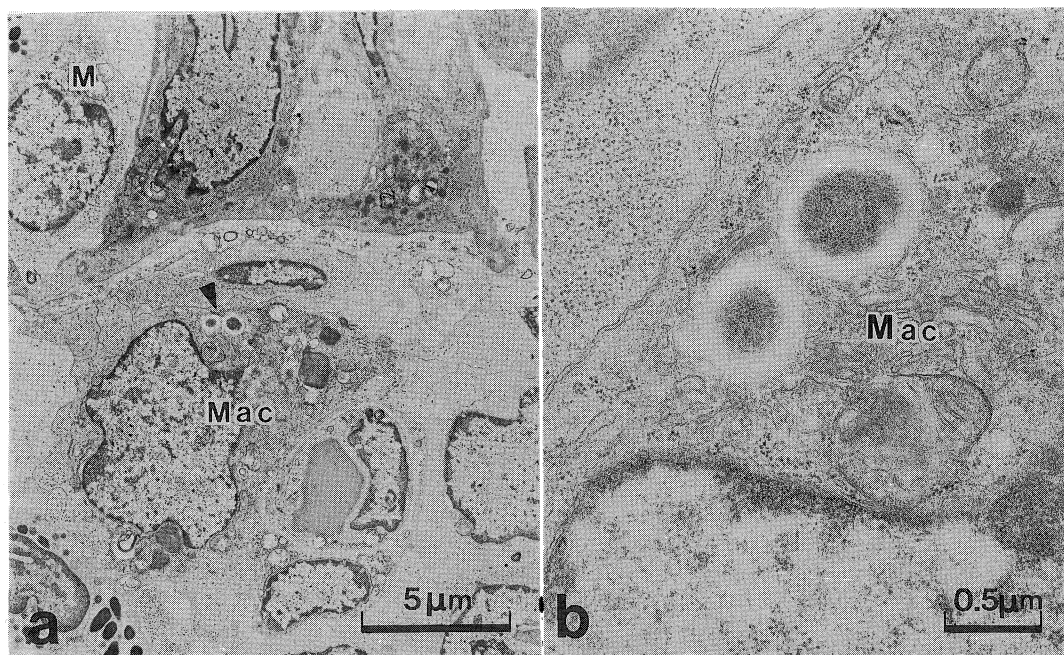


Fig. 6a, b. Transmission electron micrograph of a macrophage below the FAE. Two bacteria (arrowhead) are recognized in the macrophage.

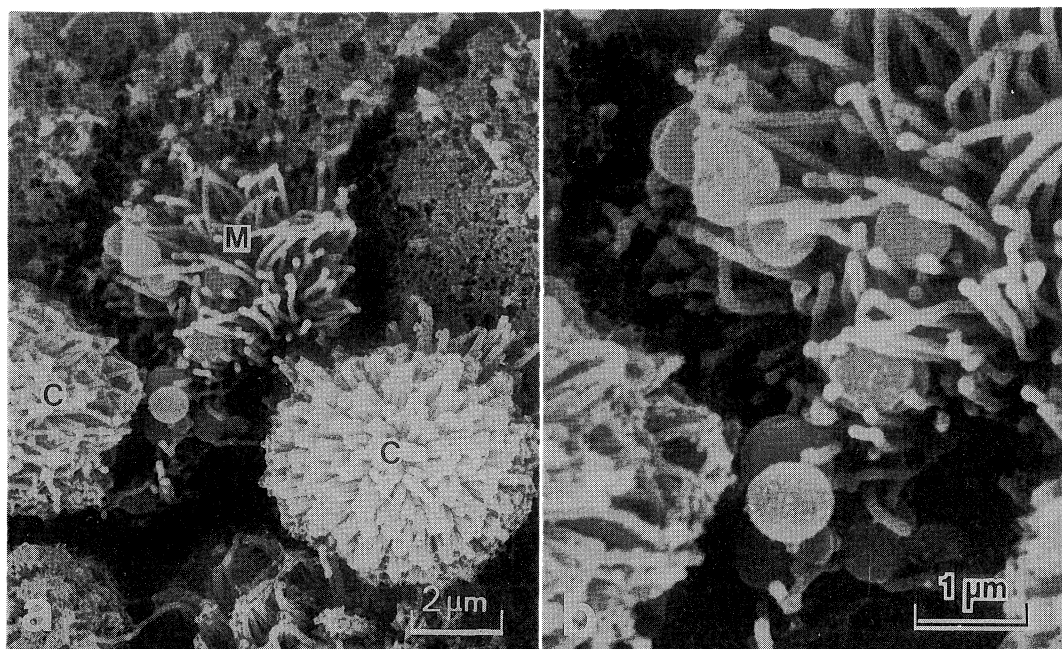


Fig. 7a, b. Scanning electron micrograph 1 hour after inoculation of OK-432. The microfolds of an M cell catch many bacteria.

M細胞細胞質小胞内の菌体, M細胞につつまこまれているマクロファージ細胞質小胞内の菌体, 濾胞被蓋上皮細胞基底膜下のマクロファージ内の菌体は形態学的に投与した溶連菌と考えられ, 菌体構造の変化に乏しいことから投与された溶連菌はM細胞により貪食され, マクロファージに転送されるものと判断した。

3. OK-432 投与群の電顕的観察

OK-432 投与後1時間の走査電顕像ではM細胞に付着する多数の菌体像を認め (Fig. 7a, b), 溶連菌投与群と同様の所見であり, 他の細胞群には菌体の付着は認められなかった。透過電顕像ではM細胞細胞質内に菌体の取りこまれている像は認めなかった。

OK-432 投与後5時間の標本を観察すると, 溶連菌投与例と同様, M細胞細胞質内にのみ投与したOK-432と思われる菌体像を認めた (Fig. 8)。Figure 8ではM細胞表面にも菌体を認める。多くの切片を観察すると, OK-432

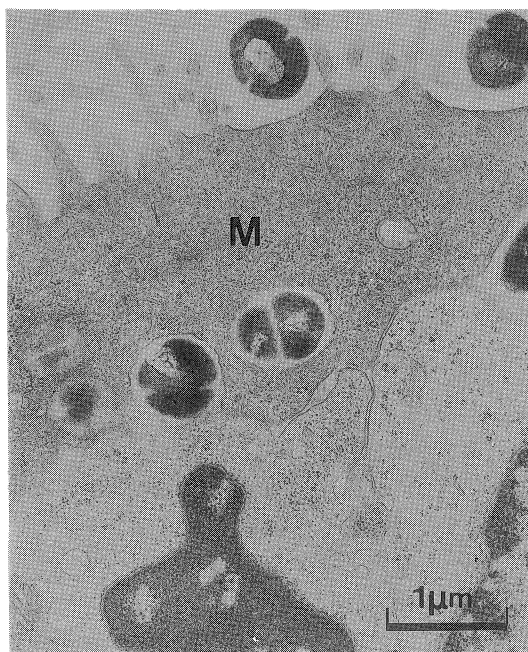


Fig. 8. Transmission electron micrograph showing many bacteria phagocytized by an M cell 5 hours after inoculation of OK-432.

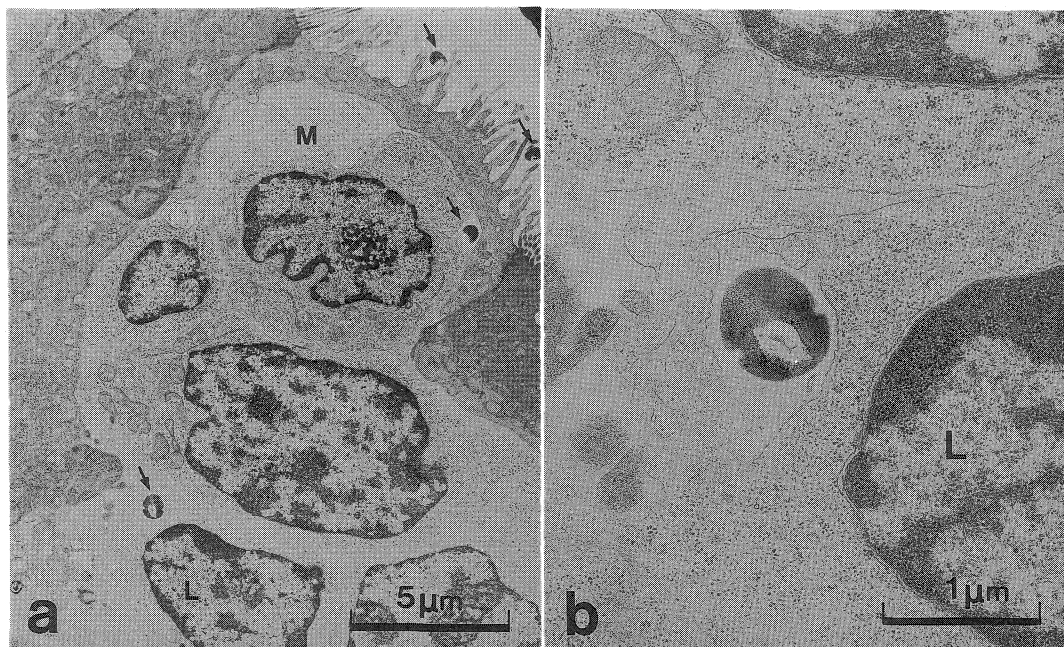


Fig. 9a, b. Five hours after inoculation of OK-432. Transmission electron micrograph of four lymphocytes (L) engulfed by an M cell (M). A bacteria, putative inoculated OK-432, is recognized in the lymphocyte (arrow: inoculated OK-432).

がM細胞 Microfold に付着し、Microfold に捕捉され、M細胞に貪食され、細胞質内を移動していく過程が観察された。Figure 9a, b は OK-432 投与後5時間のM細胞の像で、M細胞表面に2個の菌体、4個の内包されたリンパ球、矢印に投与された OK-432 と思われる菌体をM細胞細胞質内とリンパ球細胞質内に認める。他の細胞群、吸収上皮細胞間のリンパ球には OK-432 を認めることはできなかった。

考察とまとめ

生物学的反応修飾物質として種々の菌体が動物に経口的に投与され、その抗腫瘍効果が報告され、また臨床的応用も行われているが、これらの物質が腸管のいかなる細胞から取りこまれ、宿主の免疫機構に関与しているかは全く明らかにされていない。仁尾らは OK-432 を BALB/C マウスに経口投与し、各臓器への OK-432 の分布を経時的に抗A群溶連菌 Su 株抗体を用い間接蛍光抗体法で検討し、最初腸管粘膜陰窩部上皮細胞内に認められ、次第に上皮細胞全体に認められるとし、Peyer 板内では蛍光は全く観察されなかったが、Peyer 板直上の上皮細胞内では蛍光が観察されると報告した。¹⁰⁾ 一方、松本ら¹¹⁾ はラットを用い OK-432 を経口投与し、家兎に免疫して得られた抗 Su 血清を1次抗体とした PAP 法にて腸管の OK-432 局在を光顕的、電顕的に検討し、OK-432 は Peyer 板近傍の腸管から吸収され、消化管付属リンパ組織中に移行するとした。しかしながら両者とも、いかなる細胞に取りこまれ、どのように転送されるかについては全く明らかにしていない。

今回の投与実験では、多数の標本を精細に電顕視し、投与した菌体との形態学的特徴の一致、対照群の検討、M細胞以外の腸管上皮細胞群には全く取りこまれない事実、絨毛先端部よりの Persorption¹²⁾ も認められないことより、経口投与した溶連菌、OK-432 はM細胞のみによって取りこまれることを確認した。そして、M細胞に接し、またつつみこまれているマクロ

ファージ、リンパ球に転送される事実を確認した。また、基底膜をもたないM細胞¹³⁾ から遊走したと考えられる濾胞被蓋上皮細胞下のマクロファージ内にも同様の菌体を確認した。これらの所見は仁尾らの Peyer 板直上の上皮細胞内と腸管膜リンパ節に OK-432 の蛍光が認められる所見から裏づけられる。しかし、仁尾らの小腸粘膜陰窩上皮細胞内の蛍光の存在に対しては疑問が残ると考えられた。

投与した溶連菌と OK-432 の表面構造の差異としては、溶連菌は莢膜とよばれる細胞壁の外側をつつむ物質をもち、K抗原とよばれる莢膜物質に由来する抗原をもつが、ペニシリン処理された溶連菌製剤 OK-432 は莢膜を失い、細胞壁を残す不活性化生菌といわれている。しかし、投与後の溶連菌と OK-432 には電顕観察上、明らかな差異を認めず、また、取りこみに関しても明らかな差異は認められないが、その機構は不明である。溶連菌に対するペニシリンの影響、とくに細胞壁構成成分については多くの研究があるが、^{14)~16)} OK-432 に関しては溶連菌のそれとの比較検討が行われていない。

一方、M細胞が捕捉し、マクロファージ、リンパ球に転送し、抗原として提示することが判明している細菌は BCG, *Chlamydia*, *Vibrio cholerae*,⁷⁾ *Salmonella typhi*,⁸⁾ *Escherichia coli* (0:15, RDEC-1 株) が報告されている。¹⁷⁾ また、塩酸、ホルマリン、加熱処理などを受けた *Vibrio cholerae* はM細胞に取りこまれない事実が知られているが、⁷⁾ M細胞の菌体捕捉の機構に関しては明らかにされていない。しかしながら、本実験により経口投与された溶連菌、OK-432 の菌体は同じようにM細胞より特異的に貪食され、貪食された菌体は同様にM細胞に相接するマクロファージ、リンパ球に輸送されることが明確になった。

経口投与される生物学的反応修飾物質として利用される菌体はM細胞から取りこまれることが強く示唆された。

稿を終えるにあたり、御指導を賜り御校閲をいただいた川崎医科大学消化器内科教授 木原 疆教授に深く感謝いたします。また技術的援助をいただいた川崎医科大学消化器内科教室 木下幸子研究補助員に感謝い

たします。

本論文の要旨は第20回日本臨床電子顕微鏡学会において発表した。

文 献

- 1) Paul, J. R. and Conn, N. H.: Indications for vaccination against poliomyelitis. JAMA 162: 1585—1588, 1956
- 2) Calmette, A.: La vaccination preventive contre la tuberculose par le BCG. Masson et Cie. 1928
- 3) 室橋豊穂, 三浦 馨, 高橋 宏, 木ノ本雅通: BCG 経口接種モルモットの抗結核免疫力. 結核 53: 465—470, 1978
- 4) Schneider, W. and Sabin, S.: Die orale Immunisierung gegen Typhus. Dtsch. Med. Wochenschr. 109: 592—594, 1984
- 5) Fujimura, Y.: Functional morphology of microfold cell (M cell) in Peyer's patches —Phagocytosis and transport of BCG by M cells into rabbit Peyer's patches—. Gastroenterol. Jpn. 21: 325—335, 1986
- 6) Owen, R. L. and Jones, A. L.: Epithelial cell specialization within human Peyer's patches. An ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. Gastroenterology 66: 189—203, 1974
- 7) Wolf, J. L.: The membranous epithelial (M) cell: A portal of antigen entry. In Inflammatory bowel disease, eds. by Kirsner, J. B. and Shorter, R. G. Philadelphia, Lea and Febiger. 1988, pp. 75—78
- 8) Kohbata, S., Yokoyama, H. and Yabuchi, E.: Cytopathogenic effect of *Salmonella typhi* GIFU 10007 on M cells of murine ileal Peyer's patches in ligated ileal loops: An ultrastructural study. Microbiol. Immunol. 30: 1225—1237, 1986
- 9) Tsutsui, K., Kunon, H., Ichikawa, H. and Tawara, J.: Preparative method for suspended biological materials for SEM by using of polycationic substance layer. J. Electron Microsc. 25: 163—164, 1976
- 10) 仁尾義則, 大垣和久, 稲本 俊, 堀 泰裕, 中山 昇, 山崎信保, 菅 典道, 日笠頼則, 土谷利晴, 永井利博, 児玉 宏, 戸部隆吉: ビンバニール (OK-432) 経口投与の試み (第2報) —腸管免疫の観点より: その吸収過程と消化管リンパ組織の反応について—. J. Jpn. Soc. Cancer Ther. 19: 71—79, 1984
- 11) 松本純夫, 永井研治, 杉本辰雄, 杵名哲治, 野本信之助, 吉崎 聡: OK-432経口投与によって誘導される胸管リンパ球の細胞障害性の解析. 日消外会誌 19: 2159, 1986
- 12) Von Gerhard Volkheimer: Persorption. Gastroenterologie und Stoffwechsel. Band 2. Stuttgart, Georg Thieme Verlag. 1972
- 13) Shimazui, T.: An ultrastructural study of the pathway and the location of migrating lymphocytes through the intestinal microfold cells (M cells). J. clin. Electron Microsc. 18: 127—140, 1985
- 14) Bergholm, A. M., Wagner, B., Holm, S. E. and Wagner, M.: The influence of penicillin on growth and morphology of *Streptococcus pyogenes* in vivo. Zbl. Bakt. Hyg. A 259: 90—103, 1985
- 15) Krause, R. M.: Antigenic and biochemical composition of hemolytic streptococcal cell walls. Bacteriol. Rev. 27: 369—379, 1963
- 16) Alkan, M. L. and Beachey, E. H.: Excretion of lipoteichoic acid by group A streptococci. Influence of penicillin on excretion and loss of ability to adhere to human oral mucosal

cells. J. clin. Invest. 61: 671—677, 1978

- 17) Uchida, J.: An ultrastructural study on active uptake and transport of bacteria by microfold cells (M cells) to the lymphoid follicles in the rabbit appendix. J. clin. Electron Microsc. 20: 389—394, 1987